

All assay chemicals

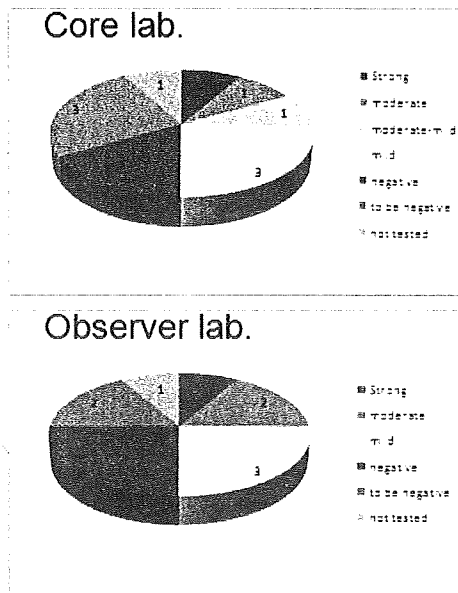
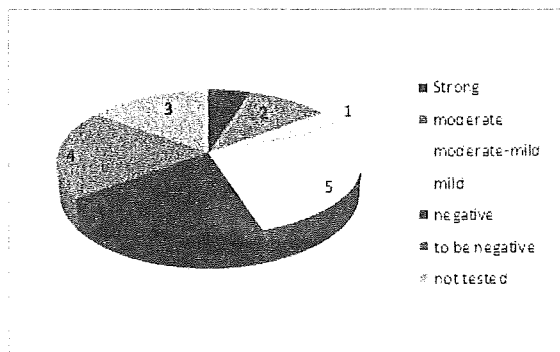


図 1-3 Task3 測定化合物全体および試験グループごとの予想活性分布

表 1-1 Task2 実施前の暫定基準値と更新された評価基準値

Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay			
	Prior	New	
Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2)	> 6	≥ 4 (>6 recommend)	
RTA of 1 nME2	> 100%	≥ 100%	
RTA of 1 μM OHT	< 16.9%	≠ < 39.4%	
RTA of 100 μM Dig.	< 0%	≠ < 0%	
RTA : Relative transcriptional activation			
Performance Criteria for anti-estrogenic assay (Acceptable range for reference chemicals)			
	Prior	New	
OHT	log [lin.IC30]	-9.86 ~ -8.76	-9.62 ~ -8.73
	log [lin.IC50]	-9.79 ~ -8.28	-9.46 ~ -8.16
	log [var.IC50]	-9.15 ~ -8.94	-9.32 ~ -8.20
TAM	log [lin.IC30]	-7.88 ~ -6.99	-7.55 ~ -6.84
	log [lin.IC50]	-7.48 ~ -6.50	-7.08 ~ -6.26
	log [var.IC50]	-7.17 ~ -6.77	-7.02 ~ -6.32
RU486	log [lin.IC30]	-6.20 ~ -5.32	-6.18 ~ -5.41
	log [lin.IC50]	-5.70 ~ -5.09	-5.61 ~ -5.08
	log [var.IC50]	-6.22 ~ -5.32	-5.53 ~ -4.86
Negative cotrol (Flutamide)	log [lin.IC30]	-	-
	log [lin.IC50]	-	-
	log [var.IC50]	-	-

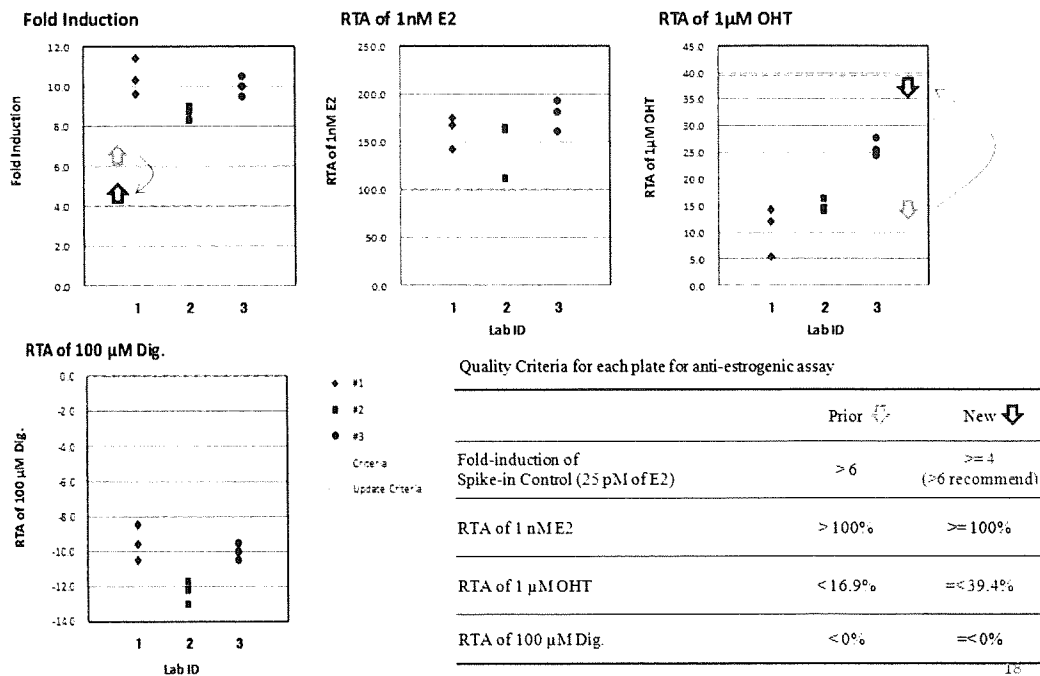


図 1-4 国内 3 施設の Task2 測定結果における品質評価基準値の分布

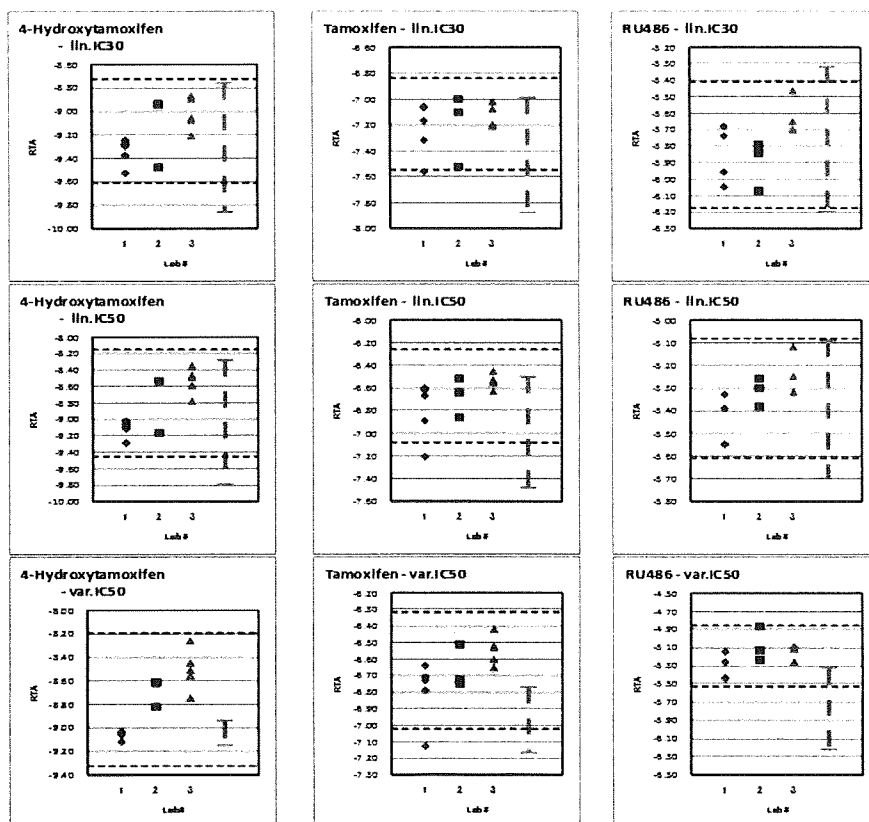


図 1-5 国内 3 施設の Task2 測定結果における陽性参照物質の性能評価基準値の分布

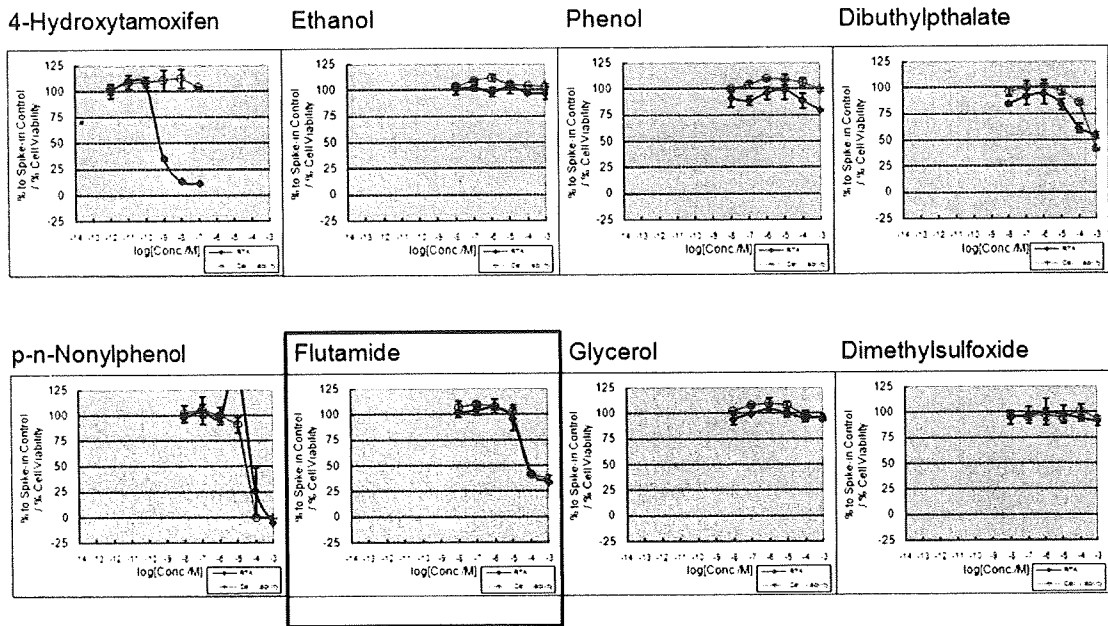


図 1-6 陰性参照物質の検討

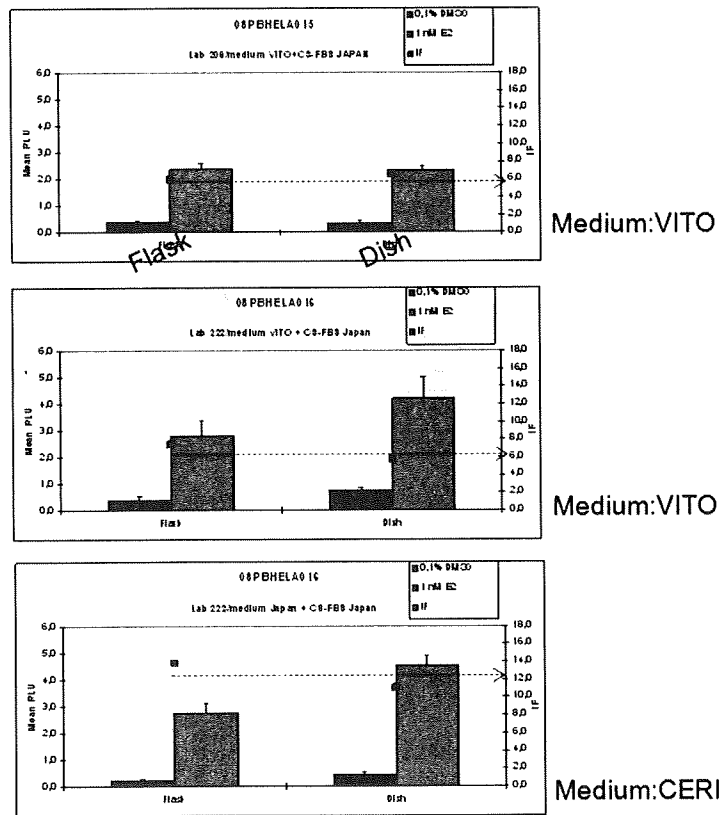
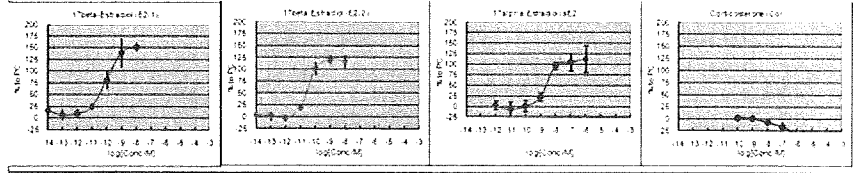


図 1-7 培養液調整に用いる水の測定結果に与える影響

KFDA

Fold Induction (FI)	2.3	FALSE
1+2SD vs *	1.2	
10%PC-FI	1.1	FALSE
E2(1)	logPC10	-12.0 PASS
	logPC50	-10.5 PASS
E2(2)	logPC10	-11.4 PASS
	logPC50	-10.6 PASS
aE2	logPC10	-9.6 PASS
	logPC50	-8.6 PASS
Cor	logPC10	- PASS
	logPC50	- PASS



Japan (CERI)

Fold Induction (FI)	2.6	FALSE
1+2SD vs *	1.2	PASS
10%PC-FI	1.2	PASS
E2(1)	logPC10	-11.9 PASS
	logPC50	-10.5 PASS
E2(2)	logPC10	-11.8 PASS
	logPC50	-10.6 PASS
aE2	logPC10	-9.7 PASS
	logPC50	-8.8 PASS
Cor	logPC10	- PASS
	logPC50	- PASS

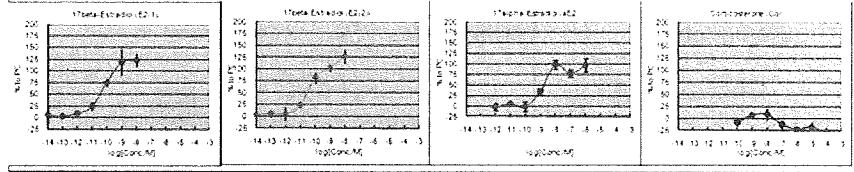
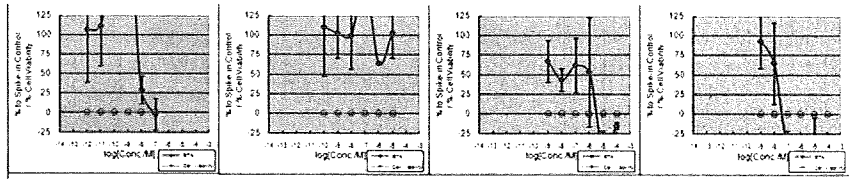


図 1-8 KFDA 現地トレーニングでのアゴニスト測定結果

KFDA

Fold Induction	1.4	FALSE
RTA of 1nM E2	249.16	Pass
RTA of 1μM OHT	2.28	Pass
RTA of 100 μM Diq	-230.10	Pass
OHT	log [In IC50]	-8.18 Fail
	log [In IC50]	-8.09 Fail
TAM	log [In IC50]	-6.05 Fail
	log [In IC50]	- Fail
RU486	log [In IC50]	-8.28 Fail
	log [In IC50]	-8.19 Fail
Cor	log [In IC50]	-7.86 Fail
	log [In IC50]	- Fail



Japan (CERI)

Fold Induction	1.7	FALSE
RTA of 1nM E2	178.70	Pass
RTA of 1μM OHT	23.96	FALSE
RTA of 100 μM Diq	-145.17	Pass
OHT	log [In IC50]	-8.07 Fail
	log [In IC50]	-7.60 Fail
TAM	log [In IC50]	- Fail
	log [In IC50]	- Fail
RU486	log [In IC50]	-6.27 Fail
	log [In IC50]	-8.51 Fail
Cor	log [In IC50]	-7.96 Fail
	log [In IC50]	- Fail

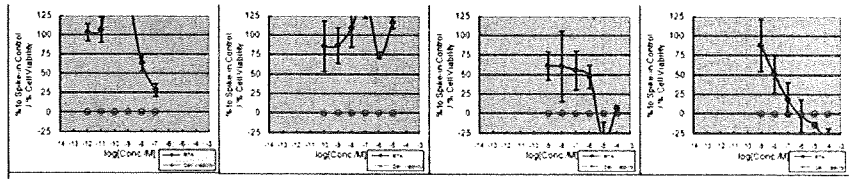
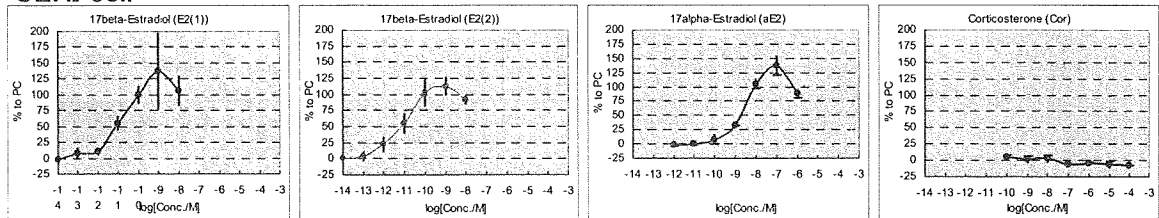


図 1-9 KFDA 現地トレーニングでのアンタゴニスト測定結果

CERI cell



NiFDS cell

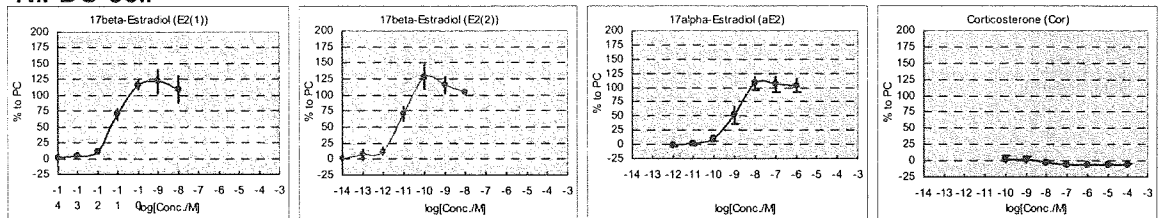


図 1-10 CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の細胞の活性の確認結果

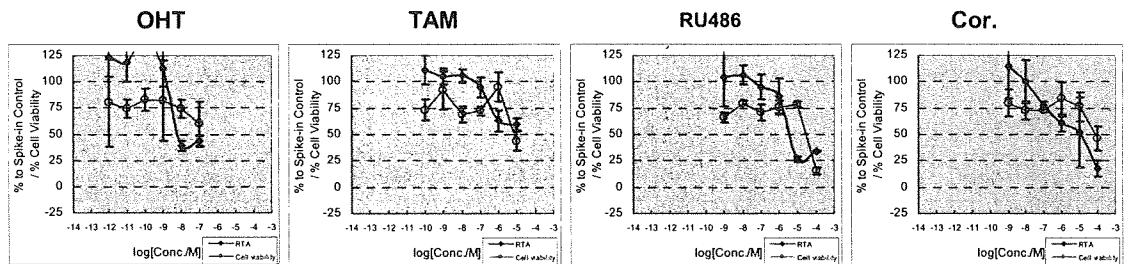


図 1-11 CERI で調製した DCC-FBS を用いた KFDA でのアッセイ結果

表 1-2 細胞 lot.、血清 lot.及びその組み合わせについての検討結果

条件	①		②		③		④		⑤		⑥		⑦		⑧		⑨							
血清Lot.	DCC-FBS①Lot.456025																DCC-FBS②Lot.672248		DCC-FBS③Lot.099953					
細胞Lot.	細胞① Lot.080822(+5+2)				細胞② Lot.080820(+4)				細胞① Lot.080822(+5+2)				細胞② Lot.080820(+4)				細胞① Lot.080822(+5+2)				細胞② Lot.080820(+4)			
継代																	+2時に播種							
Plate Lot.	Plate①#136101 Lot.099953				Plate②#136102 Lot.102598								Plate①#136101 Lot.099953											
Fold Induction	3.2	Fail	2.9	Fail	3.0	Fail	5.0	>=4 Pass	6.3	> 6 Pass	2	> 6 Pass	6.1	> 6 Pass	7	Fail	3.7	Fail						
RTA of 1nM E2	159.76	Pass	141.04	Pass	187.12	Pass	152.77	Pass	155.88	Pass	150.63	Pass	150.97	Pass	150.10	Pass	161.00	Pass						
RTA of 1µM OHT	-22.50	Pass	-29.03	Pass	-15.42	Pass	-2.20	Pass	9.66	Pass	0.21	Pass	7.81	Pass	-1.61	Pass	-0.20	Pass						
RTA of 100 µM Dig.	-43.75	Pass	-51.90	Pass	-49.09	Pass	-23.92	Pass	-17.76	Pass	-1.81	Pass	-18.75	Pass	-3.79	Pass	-35.01	Pass						
OHT	log[ln.IC30]	-9.62	in ±2SD	-9.50	in ±2SD	-9.34	in ±2SD	-9.59	in ±2SD	-9.26	in ±2SD	-9.47	in ±2SD	-9.33	in ±2SD	-9.54	in ±2SD	-9.28	in ±2SD					
	log[ln.IC50]	-9.34	in ±2SD	-9.27	in ±2SD	-9.12	in ±2SD	-9.27	in ±2SD	-8.95	in ±2SD	-9.19	in ±2SD	-8.99	in ±2SD	-9.28	in ±2SD	-9.03	in ±2SD					
TAM	log[ln.IC30]	-7.57	Fail	-7.57	Fail	-7.29	in ±2SD	-7.46	in ±2SD	-6.96	in ±2SD	-7.52	in ±2SD	-7.26	in ±2SD	-7.53	in ±2SD	-7.02	in ±2SD					
	log[ln.IC50]	-7.22	Fail	-7.20	Fail	-6.83	in ±2SD	-6.93	in ±2SD	-6.51	in ±2SD	-7.14	Fail	-6.70	in ±2SD	-7.12	Fail	-6.60	in ±2SD					
RU486	log[ln.IC30]	-6.38	Fail	-7.29	Fail	-6.18	in ±2SD	-6.21	Fail	-6.10	in ±2SD	-6.00	in ±2SD	-5.88	in ±2SD	-6.45	Fail	-6.11	in ±2SD					
	log[ln.IC50]	-5.83	Fail	-5.95	Fail	-5.75	Fail	-5.70	Fail	-5.58	in ±2SD	-5.60	in ±2SD	-5.49	in ±2SD	-5.76	Fail	-5.62	Fail					
Flu.	log[ln.IC30]	-5.25	-	-	-	-4.94	-	-4.99	-	-4.77	-	-4.55	-	-4.52	-	-4.94	-	-4.80	-					
	log[ln.IC50]	-4.72	-	-	-	-4.61	-	-4.45	-	-4.22	-	-	-	-4.47	-	-4.33	-	-	-					

表 1-3 Observer グループの Task3 測定化合物

Substance	CAS	CERI	Core	Observer	Candidates as (CERI data)
ICI 182,780	129453-61-8	X	X	X	
4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	X	X	X	moderate
Clomiphene citrate(cis and trans mixture)	50-41-9	X		X	moderate-mild
Mifepristone(Mifeprax)=RU-486	84371-65-3	X	X	X	mild
4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol	1478-61-1	X		X	mild
4,4'-Cyclohexylidenebisphenol	843-55-0	X		X	mild
Flutamide	13311-84-7	X	X	X	Negative
Dibutyl phthalate	84-74-2	X		X	Negative
17b-estradiol	50-28-2	X	X	X	to be negative
Genistein	446-72-0	X		X	to be negative
Resveratrol	501-36-0	X		X	to be negative
p-n-nonylphenol	104-40-5	X		X	not tested

表 1-4 国内3施設における Task3 アンタゴニスト作用の評価結果

ID	Substance	lab	Assay ID	Effect	Lin IC20tox	Lin IC30	Lin IC50	Comment	
ATG001 Strong	ICI 182,780	CERI	2		NA	-9.75	-9.44		
			3		NA	-9.80	-9.45		
			4		NA	-9.82	-9.51		
		KTR	1		NA	-10.14	-9.77		
			2		NA	-9.81	-9.51		
			3		NA	-9.74	-9.45		
			4		NA	-9.97	-9.65		
			5		NA	-9.83	-9.57		
		Otsuka	1		NA	-9.77	-9.33		
2			NA	-9.56	-9.28				
3			NA	-9.70	-9.31				
ATG002 mid	Mifepristo ne(Mifepr ex)=RU- 486	CERI	2		-4.60	-5.61	-5.21		
			3		-4.66	-5.48	-5.18		
			4		-4.70	-5.61	-5.21		
		KTR	1		-4.73	-5.39	-5.05		
			2		-4.81	-5.03	NA		
			3		-4.78	-5.06	NA		
			4		-5.22	-5.43	-5.23	Fl<4	
			5		-4.89	-5.05	NA		
		Otsuka	1		NA	-5.78	-5.12		
2			-4.21	-5.58	-5.08				
3			-4.12	-5.67	-5.26				
ATG003 mild	4,4'- (Hexafluor oisopropyl idene)diph enol	CERI	2	Nega	-4.87	-4.47	-4.36		
			3	Nega	-4.87	-4.48	-4.36		
			4	Nega	-4.79	-4.46	-4.36		
		KTR	1	Nega	-4.92	-4.66	-4.52		
			2	Nega	-4.93	-4.41	-4.29		
			3	Nega	-4.80	-4.30	-4.20		
			4	Nega	-4.86	-4.42	-4.32		
			5	Nega	-5.00	-4.34	-4.26		
		Otsuka	1	Nega	-4.84	-4.53	-4.40		
2	Nega		-4.92	-4.44	-4.33				
3	Nega		-4.74	-4.58	-4.41				
ATG005 moderate	4- Hydroxyta moxifen	CERI	2		NA	-9.11	-8.62		
			3		NA	-8.95	-8.48		
			4		NA	-9.15	-8.73		
		KTR	1		-7.04	-9.44	-9.26		
			2		NA	-8.52	-8.28		
			3		NA	-8.26	-8.05		
			4	Nega	-10.17	-8.91	-8.50	Fl<4	
			5		NA	-8.51	-8.20		
		Otsuka	1		NA	-8.82	-8.52		
2			NA	-8.62	-8.38				
3			NA	-8.74	-8.48				
ATG007 moderate- mild	Clomiphe ne citrate(cis and trans mixture)	CERI	2		-4.94	-6.77	-6.30		
			3		-4.99	-6.85	-6.30		
			4		-4.92	-6.84	-6.32		
		KTR	1		-5.23	-6.69	-6.46		
			2		-4.95	-5.52	-4.92		
			3		-4.80	-5.22	-4.82		
			4	Nega	-5.29	-4.98	-4.77		
			5		-5.35	-5.80	-4.89		
		Otsuka	1		-4.80	-6.15	-4.85		
2			-4.95	-5.47	-4.81				
3			-4.88	-6.21	-5.49				
ATG008 negative	Dibutyl phthalate	CERI	2	Nega	-4.69	NA	NA		
			3	Nega	-4.52	-4.63	NA		
			4	Nega	-4.32	-4.43	NA		
		KTR	1	Nega	-4.53	NA	NA		
			2	Nega	-4.66	-4.25	NA		
			3	Nega	-4.33	-4.56	NA		
			4	Nega	-4.90	-5.02	NA		
			5	Nega	-4.73	NA	NA		
		Otsuka	1	Nega	NA	NA	NA		
2	Nega		-4.18	-4.09	NA				
3	Nega		NA	NA	NA				
ATG010 negative	Flutamide	CERI	2	Nega	-4.91	-4.54	-4.07		
			3	Nega	-5.49	-4.66	-4.13		
			4	Nega	-4.83	-4.79	-4.15		
		KTR	1	Nega	-4.22	-4.09	NA		
			2	Nega	-4.90	-4.82	-4.51		
			3	Nega	-4.74	-4.75	-4.28		
			4	Nega	-5.78	-5.17	-4.22		
			5	Nega	-4.94	-4.55	-4.23		
		Otsuka	1	Nega	-7.00	-4.38	-3.71		
2	Nega		-5.03	-3.90	-3.30				
3	Nega		-4.26	-3.40	NA				
ATG011 mild	4,4'- Cyclohexy lidenebis phenol	CERI	2	Nega	-4.73	-4.45	-4.33		
			3	Nega	-4.84	-4.38	-4.27		
			4	Nega	-4.82	-4.40	-4.30		
		KTR	1	Nega	-4.86	-4.62	-4.48		
			2	Nega	-4.83	-4.35	-4.27		
			3	Nega	-4.80	-4.31	-4.23		
			4	Nega	-4.93	-4.29	-4.22		
			5	Nega	-4.91	-4.27	-4.21		
		Otsuka	1	Nega	-4.53	-4.26	-4.13		
2	Nega		-4.46	-4.08	NA				
3	Nega		-4.96	-4.27	-4.18				
ATG014 to be negative	Genistein	CERI	2	Nega	-4.49	NA	NA		
			3	Nega	-4.89	NA	NA		
			4	Nega	-4.73	NA	NA		
		KTR	1	Nega	-4.57	NA	NA		
			2	Nega	-4.74	NA	NA		
			3	Nega	-4.69	NA	NA		
			4	Nega	-8.06	NA	NA		
			5	Nega	-4.78	NA	NA		
		Otsuka	1	Nega	-4.10	NA	NA		
2	Nega		NA	NA	NA				
3	Nega		-4.38	NA	NA				
ATG016 not tested	p-n- nonylphen ol	CERI	2	Nega	-4.73	-4.56	-4.42		
			3	Nega	-5.49	-4.55	-4.41		
			4	Nega	-4.85	-4.54	-4.41		
		KTR	1		NA	-4.48	-4.39		
			2	Nega	-4.82	-4.61	-4.47		
			3	Nega	-4.87	-4.63	-4.47		
			4	Nega	-4.95	-4.68	-4.56	Fl<4	
			5	Nega	-4.98	-4.48	-4.38		
		Otsuka	1	Nega	-3.77	-3.49	-3.35		
2	Nega		-3.65	-3.51	-3.38				
3	Nega		-3.68	NA	NA				
ATG018 to be negative	Resveratr ol	CERI	2	Nega	-4.23	-3.19	-3.14		
			3	Nega	-4.96	-3.16	-3.12		
			4	Nega	-4.62	-3.20	-3.15		
		KTR	1	Nega	-4.11	-4.03	NA		
			2	Nega	-4.36	NA	NA		
			3	Nega	-5.13	NA	NA		
			4	Nega	-5.24	NA	NA		
			5	Nega	-4.72	NA	NA		
		Otsuka	1	Nega	NA	-3.61	-3.62		
2	Nega		-6.20	-4.03	-3.96				
3	Nega		-3.56	-3.94	-3.70				
ATG020 to be negative	17b- estradiol	CERI	2	Nega	-5.44	NA	NA		
			3	Nega	-5.67	NA	NA		
			4	Nega	-5.64	NA	NA		
		KTR	1	Nega	-4.58	NA	NA		
			2	Nega	-5.80	NA	NA		
			3	Nega	-5.32	NA	NA		
			4	Nega	-6.16	NA	NA		
			5	Nega	-5.64	NA	NA		
		Otsuka	1	Nega	-3.72	NA	NA		
2	Nega		NA	NA	NA				
3	Nega		NA	NA	NA				

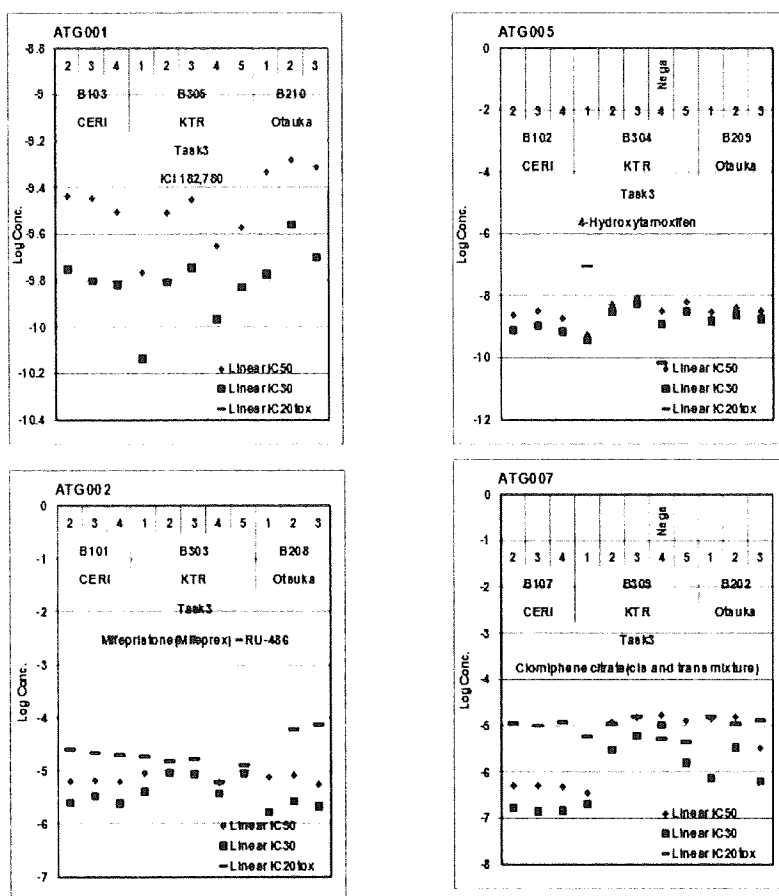


図 1-12 国内3施設 Task3 でアンタゴニスト作用が検出された化合物の IC 値の比較

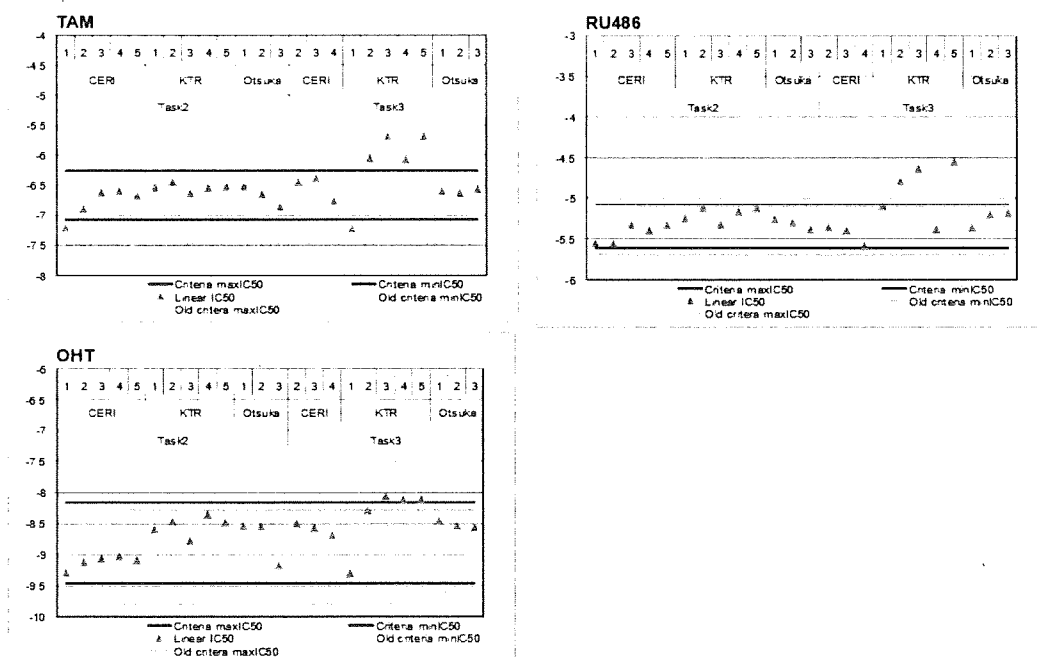


図 1-13 国内3施設の Task2、Task3 における参照化合物の性能評価基準値の分布

厚生科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）平成 21 年度分担研究報告書 図表
 2. Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験の実施

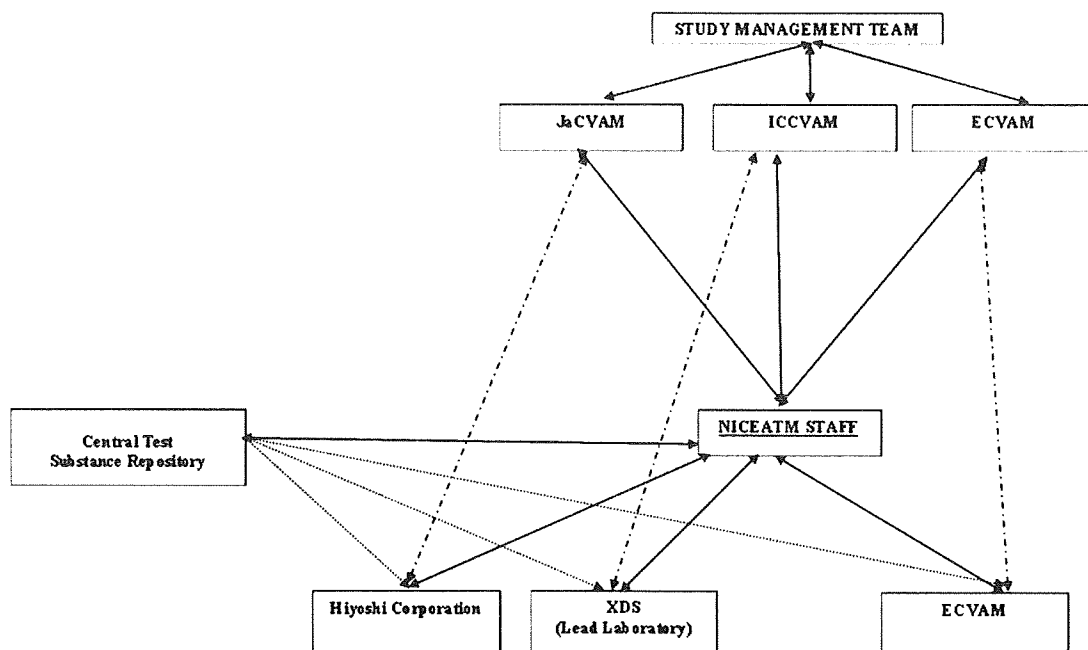


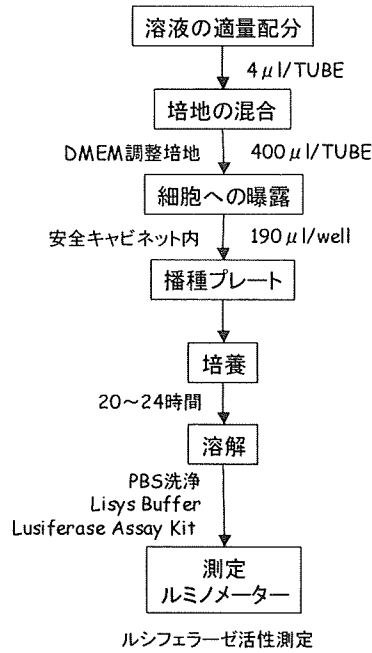
図 2-1 LumiCell アッセイバリデーション試験組織図

STUDY PHASE	ACTIVITY
Phase I	Each laboratory conducts multiple testing of reference standards and controls to demonstrate proficiency with agonist and antagonist protocols, establish historical databases to be used to develop acceptability criteria for tests conducted in Phase IIa, and to provide measured for calculated reference standard and control data for an evaluation of intra- and inter-laboratory reproducibility.
Phase IIa	Four substances each from the ICCVAM recommended ER minimum list tested independently by each laboratory three times for agonist and antagonist activity.
Phase IIb	Eight substances each from the ICCVAM recommended ER minimum list tested independently by each laboratory three times for agonist and antagonist activity.
Phase III	Remaining 41 substances from ICCVAM recommended ER minimum list tested once by each laboratory for agonist and antagonist activity.
Phase IV	Remaining 25 substances from ICCVAM recommended ER list tested once each by the lead laboratory only for agonist and antagonist activity.

All participant Lab

XDS only

図 2-2 LumiCell アッセイバリデーション試験実施計画



アゴニスト試験	ST#1~#11(#9除)	17β-estradiol	10ng/ml	
	SA	各試料	-	
	ポジコン ネガコン	Methoxychlor DMSO	313 mg/ml -	
アンタゴニスト試験	ST#1~#9	Raloxifene	2.5μg/ml	同量の17β-estradiol 5ng/mlで混合
	SA	各試料	-	
	ポジコン1	Flavone	5mg/ml	
	ポジコン2 ネガコン	17β-estradiol DMSO	2.5ng/ml -	- -

・RPMI1640 調整培地
 (8% fetal calf serum+1%penisillin/streptomycin)
 ・DMEM 調整培地
 (10% Carbon Stripped fetal calf serum+1%penisillin/streptomycin+2%L-glutamine)

図 2-3 Lumi-Cell ER アッセイの操作フロー

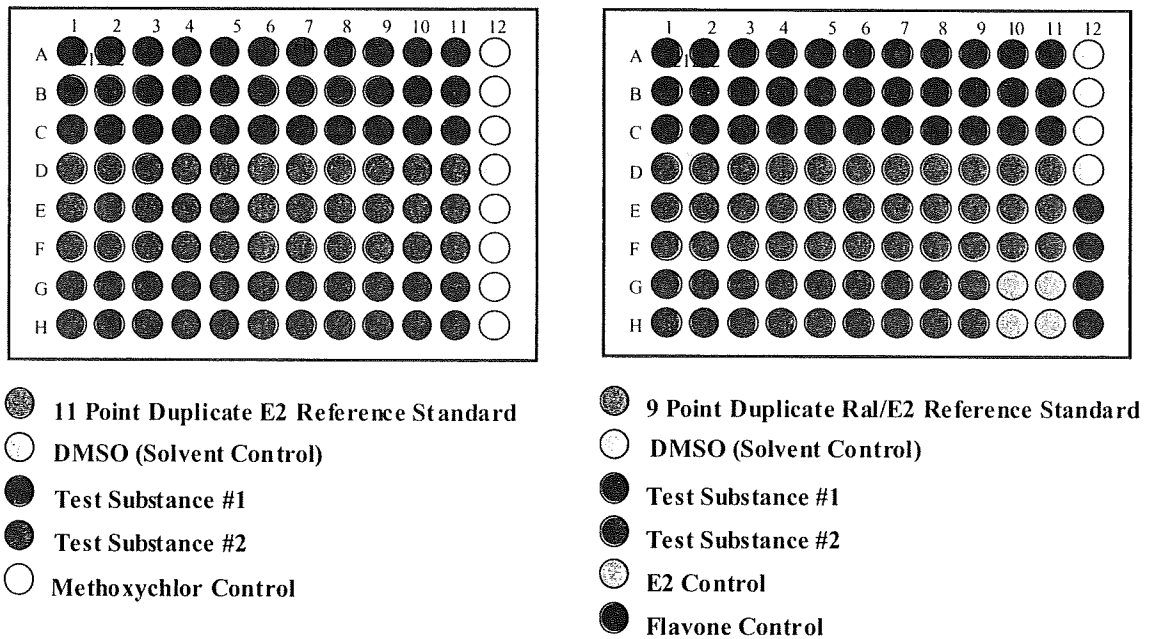


図 2-4 Comprehensive testing ; 96 穴プレートレイアウト
 左図 ; アゴニスト試験 右図 ; アンタゴニスト試験

Agonist Test Substance	Laboratory	ER TA Agonist Activity (activities in Bold are discordant from ICCVAM meta-data)	Agonist Test Substance	Laboratory	ER TA Agonist Activity (activities in Bold are discordant from ICCVAM meta-data)
Atrazine (ATR)	ICCVAM Meta-data	Negative	Flavone (FLA)	ICCVAM Meta-data	Positive
	XDS	Negative		XDS	Positive
	ECVAM	Positive — Negative		ECVAM	Positive
	Hiyoshi	Negative		Hiyoshi	Positive
Butylbenzyl phthalate (BBP)	ICCVAM Meta-data	Positive	Genistein (GEN)	ICCVAM Meta-data	Positive
	XDS	Positive		XDS	Positive
	ECVAM	Positive		ECVAM	Positive
	Hiyoshi	Positive		Hiyoshi	Positive
<i>o,p'</i> -DDT (DDT)	ICCVAM Meta-data	Positive	<i>p-n</i> -nonylpheno l (NON)	ICCVAM Meta-data	Positive
	XDS	Positive		XDS	Positive
	ECVAM	Positive		ECVAM	Positive
	Hiyoshi	Positive		Hiyoshi	Positive
17- α ethinyl estradiol (EE)	ICCVAM Meta-data	Positive	Vinclozolin (VIN)	ICCVAM Meta-data	Negative
	XDS	Positive		XDS	Negative
	ECVAM	Positive		ECVAM	Positive
	Hiyoshi	Positive		Hiyoshi	Negative

図 2-5 Phase II b 試験における、コード化化合物のアゴニスト活性評価結果

Antagonist Test Substance	Laboratory	ER TA Antagonist Activity (activities in Bold are discordant from ICCVAM meta-data)	Antagonist Test Substance	Laboratory	ER TA Antagonist Activity (activities in Bold are discordant from ICCVAM meta-data)
Apigenin (API)	ICCVAM Meta-data	Positive	<i>o,p'</i> -DDT (DDT)	ICCVAM Meta-data	Positive
	XDS	Negative — Positive		XDS	Negative — Positive
	ECVAM	Positive		ECVAM	Positive
	Hiyoshi	Positive		Hiyoshi	Positive
Atrazine (ATR)	ICCVAM Meta-data	<i>Negative</i>	Flavone (FLA)	ICCVAM Meta-data	Positive
	XDS	Negative — Positive		XDS	Positive
	ECVAM	Positive		ECVAM	Positive
	Hiyoshi	Positive		Hiyoshi	Negative — Positive
Butylbenzyl phthalate (BBP)	ICCVAM Meta-data	<i>Negative</i>	Genistein (GEN)	ICCVAM Meta-data	Positive
	XDS	Positive		XDS	Negative — Positive
	ECVAM	Positive		ECVAM	Positive
	Hiyoshi	Positive		Hiyoshi	Negative — Positive
Corticosterone (CORT)	ICCVAM Meta-data	<i>Negative</i>	Resveratrol (RES)	ICCVAM Meta-data	Positive
	XDS	Positive		XDS	Negative — Positive
	ECVAM	Positive		ECVAM	Positive
	Hiyoshi	Positive		Hiyoshi	Positive

図 2-6 Phase II b 試験における、コード化化合物のアンタゴニスト活性評価結果

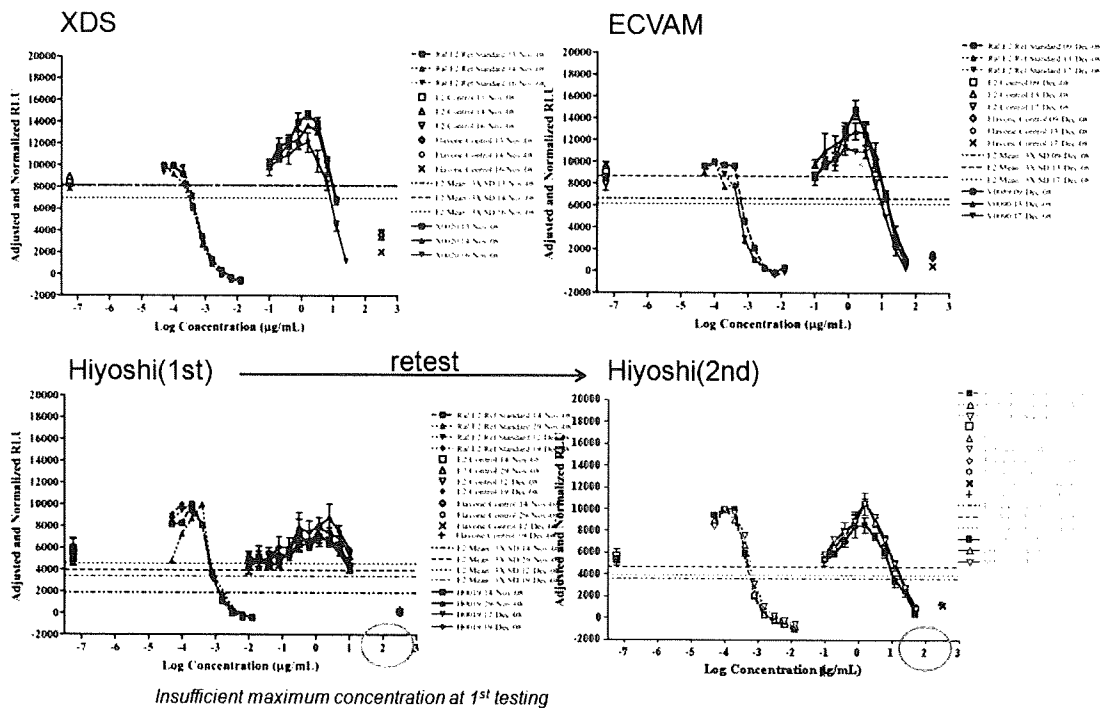


図 2-7 日吉における Flavone 再測定結果

Classification (ICCVAM vs. LUMICELL®ER)	Number of Substances ^a	Substances with Agreement at all 3 Laboratories (%) ^a	Substances with Agreement at 2 of 3 Laboratories (%) ^a
+/+	19	18 (95)	1 (5)
+/-	0	0 (0)	0 (0)
-/+	2	1 (50)	1 (50)
-/-	1	1 (100)	0 (0)
PP/+	3	3 (100)	0 (0)
PP/-	0	0 (0)	0 (0)
PN/+	5	2 (40)	3 (60)
PN/-	1	0 (0)	1 (100)
TOTAL	31	25 (81)	6 (19)

Abbreviations: PN = Presumed Negative, PP = Presumed Positive

^aNumbers reflect those substances that have been tested at all three participating laboratories to date.

図 2-8 PhaseⅢにおける 31 化合物のアゴニスト測定評価結果の施設間再現性

委託事業実施報告書

「内分泌かく乱物質スクリーニング HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲンアンタゴニスト
検出法バリデーション試験に関する業務」

財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所
武吉正博、宮浦英樹

1. 緒言

現在、日本で開発された HeLa-9903 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ(エストロゲンアンタゴニスト検出法)の OECD テストガイドライン化に向けた国際バリデーション研究が実施されており、最終段階となっている。これまでの研究の結果から韓国 NiFDS/KFDA の実験施設の技術的課題が浮上した。そこで、本バリデーション研究の目的を達成するため、開発ラボ(リードラボ)の立場から韓国 NiFDS/KFDA の現地調査を行い技術、設備等の妥当性を確認することにより課題の解決を図るとともに、バリデーション試験において示された問題の原因解明と対応の検討を実施した。

2. 方法

2.1. バリデーション実施体制の概要

本研究ではバリデーション研究の透明性及び客観性を確保するため、Study Management Team (SMT)が組織され、実験の進行に関する情報の収集、解析及び状況に応じた指示が行われている。SMT は小島肇博士(国立医薬品食品衛生研究所・新試験法評価室(JaCVAM))、小野敦博士(国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室)、Miriam Jacobs 博士(ECVAM)、Susan C. Laws 博士(US-EPA)、寒水孝司博士(大阪大学)の 5 名で構成され、さらに菅野純博士(国立医薬品食品衛生研究所)及び OECD VMG non-animal メンバーがアドバイザーとなっている。

実験の技術面の支援に関しては本法の開発施設である本施設 ((財)化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 ; CERi)がリードラボとして、試験計画書の作成、参加施設に対する実験指導、結果の解析、実験進行に伴う技術的問題点の把握及び問題解決のための技術支援を実施した。

バリデーション試験実施組織

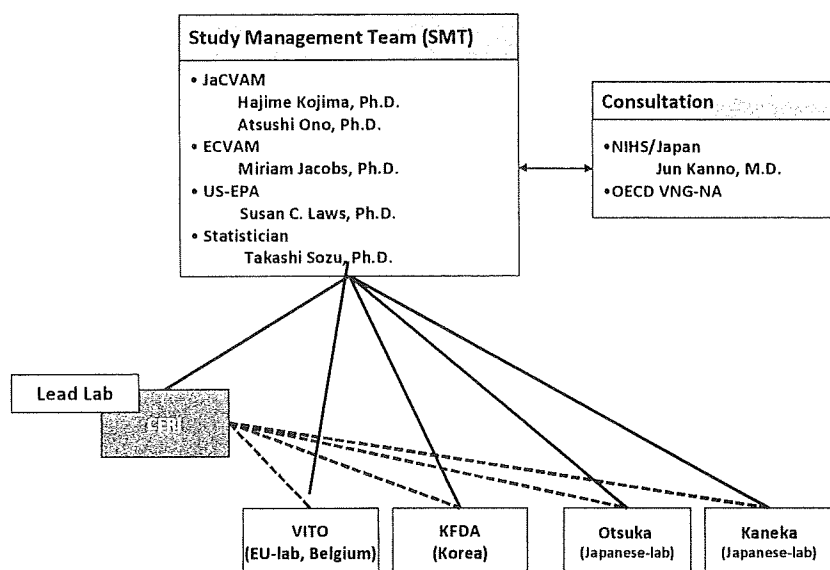


図1 バリデーション実施体制

2.1.1. 実験参加施設

下記の国内3施設、国外2施設による施設間バリデーション研究が実施されている。

施設1：株式会社カネカテクノロジー 環境分析部 環境分析センター
〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1番8号

施設2：大塚製薬株式会社 大塚診断事業部 特別プロジェクトEco-Screen開発室
〒771-0195 徳島市川内町平石字夷野224-18

施設3：財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地

施設4：Flemish Institute for Technological Research - VITO Expertise center Environmental Toxicology
Boeretang 200, BE-2400 MOL, Belgium

施設5：National Institute of Food and Drug Safety / Korea Food and Drug Administration
194 Tongil-ro, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea

2.2. 実験材料及び方法

2.2.1. 細胞及び細胞培養に関わる試薬

2.2.1.1) 細胞

HeLa-9903 (hER α)安定形質転換細胞株(住友化学株式会社)を使用した。

2.2.1.2) 10%DCC-FBS EMEM 培地

粉末培地(イーグル MEM ニススイ) 4.7 g、7.5% 重炭酸ナトリウム溶液(GIBCO)12 mL 及び 200 mM *L*-グルタミン溶液(GIBCO) 5.6 mL に精製水を加えて 500 mL とし、Dextran coated charcoal (DCC)処理した牛胎児血清(FBS) (GIBCO) 56 mL を加え、0.22 μ m のフィルター(Millipore)でろ過滅菌した。

2.2.1.3) 対照物質、標準物質及び媒体

2.2.1.4) 対照物質及び標準物質

エストロゲン活性及び抗エストロゲン活性が既知の物質として、使用した対照物質及び標準物質を表 1 に示す。

表 1 対照物質及び標準物質

対照物質及び標準物質	CAS No.	M.W.
17 β -Estradiol (E2)	50-28-2	272.4
17 α -Estradiol (α E2)	57-91-0	272.4
Corticosterone (Cor.)	50-22-6	346.5
4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)	68047-06-3	387.5
Tamoxifen (TAM)	10540-29-1	371.5
RU486	84371-65-3	429.6
Flutamide (Flu.)	13311-84-7	276.2
Digitonin (Dig.)	11024-24-1	1229.3

2.2.1.5) 溶媒対照 (VC; Vehicle Control)

溶媒対照として Dimethyl sulfoxide (DMSO)を使用した。

2.2.1.6) 陽性対照

アゴニスト活性の陽性対照として 1 nM の E2、アンタゴニスト活性評価の陽性対照として、25 pM の E2 のエストロゲン活性を抑制する 1 μ M の 4-OHT を設定した。

2.2.1.7) 抗エストロゲン活性評価における基準活性(スパイク用物質)

抗エストロゲン活性評価における基準活性として 25 pM の E2 を設定した。

2.2.1.8) 細胞毒性評価用の陽性対照

100 μ M の Dig. を細胞毒性評価の陽性対照として設定した。

2.2.1.9) 細胞の応答性評価用の対照

抗エストロゲン活性評価における基準活性が E2 の最大活性ではない(つまり、E2 の応答性が飽和していない)ことを示す対照として、E2 の最大活性を誘導することができる 1 nM の E2 を設定した。

2.2.1.10) 暴露用被験物質あるいは対照物質の調製

10%DCC-FBS EMEM 培地に DMSO で終濃度が目的濃度になるよう調製した被験物質あるいは対照物質を DMSO 終濃度がトータルで 0.2% となるように添加して調整した。

2.2.2. ルシフェラーゼ試薬の調製

Steady-Glo Luciferase Assay Reagent (プロメガ株式会社)の容器に付属の Steady-Glo Luciferase Assay buffer 全量を直接加えて溶解し、-80℃で保存した。使用時には、必要量を解凍し 0.3 mM の MgCl₂ を含む PBS と 1 : 1 で混和し、ルシフェラーゼ試薬として使用した。

2.2.3. レポーター遺伝子アッセイの基本的な手技

2.2.3.1) 操作手順

レポーター遺伝子アッセイは以下の手順に従って実施した。

10%DCC-FBS EMEM 培地を用いて HeLa-9903 細胞が 100 mm ティッシュに 75-90%コンフルエントになるように培養

↓

細胞を測定用の 96-well プレートに播種(10^4 cells/100 μ L/well)

↓

CO₂ インキュベータ内で培養(3 時間)

↓

10%DCC-FBS EMEM 培地で希釈した被験物質あるいは対照物質を 50 μ L/well で添加

↓

CO₂ インキュベータ内で培養(20~24 時間)

↓

培地の除去

↓

ルシフェラーゼ試薬の添加 (50 μ L/well)

↓

10 分間室温で静置

↓

ルミノメータによる発光測定

2.3. バリデーション実験設計

バリデーション研究は Task-1 から Task-3 の3段階に分割して実施されている。各 Task の概要を以下に示す。

2.3.1. Task-1

Task-1 では各参加ラボが本法で用いる基本的な技術に対する習熟度を確認するため、Edge 効果の有無及び代表的なアゴニスト作用物質 E2 及び α -E2 並びに非作用物質 Cor. を用いたアゴニスト実験が実施され、各ラボとも良好な結果であったことが確認されている。

	E2			E2			α E2			Cor.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ⁻⁸ M			10 ⁻⁸ M			10 ⁻⁶ M			10 ⁻⁴ M		
B	10 ⁻⁹ M			10 ⁻⁹ M			10 ⁻⁷ M			10 ⁻⁵ M		
C	10 ⁻¹⁰ M			10 ⁻¹⁰ M			10 ⁻⁸ M			10 ⁻⁶ M		
D	10 ⁻¹¹ M			10 ⁻¹¹ M			10 ⁻⁹ M			10 ⁻⁷ M		
E	10 ⁻¹² M			10 ⁻¹² M			10 ⁻¹⁰ M			10 ⁻⁸ M		
F	10 ⁻¹³ M			10 ⁻¹³ M			10 ⁻¹¹ M			10 ⁻⁹ M		
D	10 ⁻¹⁴ M			10 ⁻¹⁴ M			10 ⁻¹² M			10 ⁻¹⁰ M		
H	Vehicle Control (DMSO)						Positive Control (1 nM E2)					

図2 Task-1 アゴニスト実験におけるプレートレイアウト

表 2-1 Quality Criteria for each plate for agonistic assay (control chemical)

Fold-induction ^{*1} of 1 nM of E2	> = 4
10% fold-induction of 1 nM E2	> 1 ± 2SD of fold-induction of vehicle control
$*1: \text{Fold-induction} = \frac{(\text{Mean luminescence intensity of 1 nM of E2})}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})}$	

表 2-2 Performance Criteria for agonistic assay (標準物質の許容値)

	Log[EC50]	Log[PC50]	Log[PC10]	Hill slope
E2	-11.3 ~ -10.1	-11.4 ~ -10.1	<-11	0.7 ~ 1.5
α E2	-9.6 ~ -8.4	-9.6 ~ -8.1	-10.7 ~ -9.3	0.9 ~ 2.0
Cor.	-	-	-	

2.3.2. Task-2

Task-2 は Task-1 通過施設がアンタゴニスト活性系実験において十分なスキルを有しているか否かを判断することを目的として実施された。

Task-2 では代表的なアンタゴニスト作用物質として OHT、TAM 及び RU486、非作用物質と

して Cor.、陽性対照及びスパイク用物質として E2 並びに細胞毒性用陽性対照物質として Dig. を用い、下記のプレートアウトに従って実験が実施された。実験は最大 5 回までの実験を実施し、表 3 の性能基準を満たす実験が 3 回となった時点で Task-2 終了とした。

ただし、表 3 の基準はリードラボである CER1 のみのデータに由来する暫定基準であるため、必要に応じて見直しが行われることになっていた。先行して実施された国内 3 ラボについては、次の Task-3 実施に当たり、国内 3 ラボの Task-2 の結果を基に見直しが行われ、Task-3 は表 4 の基準に基づいて実施された。

	OHT			TAM			RU486			Cor.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ⁻⁷ M + 25 pM E2			10 ⁻⁷ M + 25 pM E2			10 ⁻⁵ M + 25 pM E2			10 ⁻⁴ M + 25 pM E2		
B	10 ⁻⁸ M + 25 pM E2			10 ⁻⁸ M + 25 pM E2			10 ⁻⁶ M + 25 pM E2			10 ⁻⁵ M + 25 pM E2		
C	10 ⁻⁹ M + 25 pM E2			10 ⁻⁹ M + 25 pM E2			10 ⁻⁷ M + 25 pM E2			10 ⁻⁶ M + 25 pM E2		
D	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2			10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2			10 ⁻⁸ M + 25 pM E2			10 ⁻⁷ M + 25 pM E2		
E	10 ⁻¹¹ M + 25 pM E2			10 ⁻¹¹ M + 25 pM E2			10 ⁻⁹ M + 25 pM E2			10 ⁻⁸ M + 25 pM E2		
F	10 ⁻¹² M + 25 pM E2			10 ⁻¹² M + 25 pM E2			10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2			10 ⁻⁹ M + 25 pM E2		
G	VC + 25 pM E2						1 μM OHT + 25 pM E2			100 μM Dig + 25 pM E2		
H	VC						1 nM E2					

図 3 Task-2 実験におけるプレートアウト

表 3-1 Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay

Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2) *1	> 6
RTA *2 of 1 nM E2	> 100%
RTA of 1 μM OHT	< 16.9%
RTA of 100 μM Dig.	< 0%

$$*1: \text{Fold-induction of Spike-in Control} = \frac{(\text{Mean luminescence intensity of Spike-in Control})}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})}$$

$$*2: \text{Relative Transcriptional Activation (RTA)} = \frac{[(\text{luminescence intensity of a well}) - (\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})]}{[(\text{Mean luminescence intensity of Spike-in Control}) - (\text{Mean of luminescence intensity of vehicle control})]}$$

表 3-2 Performance Criteria for anti-estrogenic assay (標準物質の許容値)

	log [lin.IC30]	log [lin.IC50]	log [var.IC50]
OHT	-9.86 ~ -8.76	-9.79 ~ -8.28	-9.15 ~ -8.94
TAM	-7.88 ~ -6.99	-7.48 ~ -6.50	-7.17 ~ -6.77
RU486	-6.20 ~ -5.32	-5.70 ~ -5.09	-6.22 ~ -5.32
Cor.	-	-	-

2.3.3. Task-3

Task-3 は Task-2 通過施設がコード化された物質を測定し、試験法としての再現性、妥当性、特異性等を評価する目的で実施され、現在、一部終了している。

試験の成立要件としては、先行して実施された国内 3 ラボの Task-2 の結果を基に、表 3 の性能基準の見直しが実施され、表 4 の基準が設けられた。Task-3 については、測定日毎に標準物質(Cor.は不適のため、Flu.に変更された)を測定するプレート必ず 1 枚設け、標準物質測定プレートが、表 4-1 及び 4-2 の性能基準を満し、かつ測定プレートにおいて表 4-1 を同時に満たした場合のデータを採用することになっている。

	OHT			TAM			RU486			Flu.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ⁻⁷ M + 25 pM E2			10 ⁻⁷ M + 25 pM E2			10 ⁻⁵ M + 25 pM E2			10 ⁻⁴ M + 25 pM E2		
B	10 ⁻⁸ M + 25 pM E2			10 ⁻⁸ M + 25 pM E2			10 ⁻⁶ M + 25 pM E2			10 ⁻⁵ M + 25 pM E2		
C	10 ⁻⁹ M + 25 pM E2			10 ⁻⁹ M + 25 pM E2			10 ⁻⁷ M + 25 pM E2			10 ⁻⁶ M + 25 pM E2		
D	10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2			10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2			10 ⁻⁸ M + 25 pM E2			10 ⁻⁷ M + 25 pM E2		
E	10 ⁻¹¹ M + 25 pM E2			10 ⁻¹¹ M + 25 pM E2			10 ⁻⁹ M + 25 pM E2			10 ⁻⁸ M + 25 pM E2		
F	10 ⁻¹² M + 25 pM E2			10 ⁻¹² M + 25 pM E2			10 ⁻¹⁰ M + 25 pM E2			10 ⁻⁹ M + 25 pM E2		
G	VC + 25 pM E2						1 μM OHT + 25 pM E2			100 μM Dig + 25 pM E2		
H	VC						1 nM E2					

図 4 Task-3 実験における標準物質測定プレートレイアウト

表 4-1 Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay

Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2) *1	>= 4
RTA *2 of 1 nM E2	>= 100%
RTA of 1 μM OHT	=< 39.4%
RTA of 100 μM Dig.	=< 0%

*1: Fold-induction of Spike-in Control =

(Mean luminescence intensity of Spike-in Control)

(Mean luminescence intensity of vehicle control)

[(luminescence intensity of a well) – (Mean luminescence intensity of vehicle control)]

*2: Relative Transcriptional Activation (RTA)=

[(Mean luminescence intensity of Spike-in Control)

– (Mean of luminescence intensity of vehicle control)]

表 4-2 Performance Criteria for anti-estrogenic assay (標準物質の許容値)

	log [lin.IC30]	log [lin.IC50]	log [var.IC50]
OHT	-9.62 ~ -8.73	-9.46 ~ -8.16	-9.32 ~ -8.20
TAM	-7.55 ~ -6.84	-7.08 ~ -6.26	-7.02 ~ -6.32
RU486	-6.18 ~ -5.41	-5.61 ~ -5.08	-5.56 ~ -4.86
Flu.	-	-	-

2.4. データ解析

2.4.1. 抗エストロゲン活性評価指標の算出

各濃度区の発光強度の値から溶媒対照区(VC)の平均値から差し引き、算出された 25 pM E2 の平均値でさらに各濃度区の値を除して 25 pM E2 に対する相対転写活性化倍率(RTA; Relative Transcriptional activity (%))を求めた。これら相対転写活性化倍率を用いて、以下の式より IC50 を算出した。IC50 値の算出には GraphPad Prism[®] Ver. 4 (GraphPad Software 社)を用いた。また、図 2 で定義される 25 pM の E2 に対する RTA を 30 あるいは 50%抑制する濃度 (lin.IC30 あるいは lin.IC50) を求めた。

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))})$$

ここで、HillSlope: 傾き

X: 対数濃度 (M)

Y: 相対転写活性化倍率の抑制率 (%)

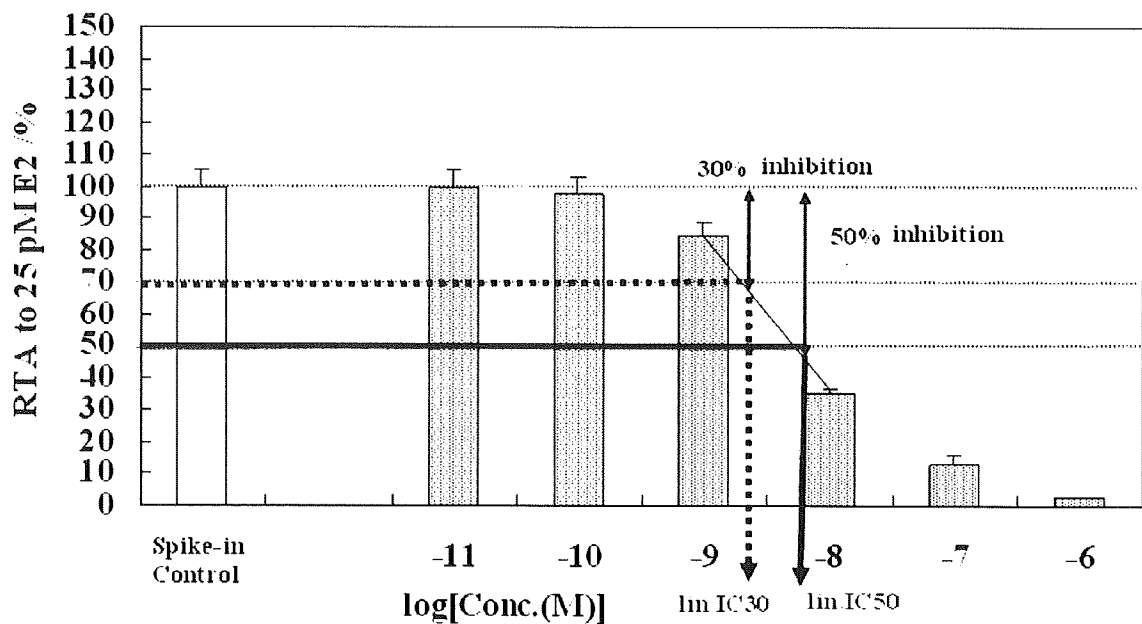


図 2 lin.IC30 あるいは lin.IC50 の定義

2.5. 韓国 NiFDS/KFDA の技術、設備等の妥当性の確認及び問題の原因解明と対応の検討

2.5.1. 韓国 NiFDS/KFDA 現地調査による技術、設備等の妥当性の確認

これまでの研究の結果から Task-2 において、韓国 NiFDS/FDA の実験施設の技術的課題が浮上していた。そこで、課題の解決を図り、本バリデーション研究の目的を達成するため、NiFDS/KFDA の現地調査を行い、以下の項目について技術、設備等の妥当性の確認を行った。

- ・ 被験物質調製手技確認
Preparation of Stock Solution of Chemicals (C-1, D-1)
- ・ 培養試薬類調製手技確認
Preparation of
 - 7.5w/v% NaHCO₃ (A-2-2)
 - 200 mM L-Glutamine aq. (A-2-3)
 - PBS(-) (A-3)
 - Trypsin-EDTA solution (A-4)
 - 10%DCC-FBS-EMEM (A-2-1)
- ・ アッセイ(細胞継代、播種)手技確認(CERI, KFDA 同時実施)
Cell Propagation (B-3)
Cell Seeding in 96-well plates (C-2, D-2)
各 Agonist 用、Antagonist 用、Cytotoxicity 用の 3plate 調製
継代 3 枚
- ・ アッセイ(被験物質添加)手技確認(CERI, KFDA 同時実施)
Chemical Exposure to Cells [Agonist] (C-3-1, D-1, D-2)
Chemical Exposure to Cells [Antagonist : Reference Chemicals] (C-3-2, D-1, D-2)
3plate それぞれ曝露
- ・ 測定試薬調製手技確認
Preparation of 1M MgCl₂ aq. (A-1-2)
Preparation of PBS(+) (A-5)
Preparation of Luciferase Assay Reagents (A-6)
- ・ 培地交換手技確認
Medium Replacement (B-2, D-2)
- ・ アッセイ(ルシフェラーゼ化学発光測定)手技確認(CERI, KFDA 同時実施)
Luciferase Assay (C-4)
- ・ DCC-FBS 調製手技確認
Preparation of DCC-FBS (A-1)
- ・ データ解析
Data analysis

2.5.2. CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の細胞の活性のクロスチェック

韓国 NiFDS/FDA の細胞ストックは、JCRB より購入し、2 継代目で凍結保存、現地調査時はこれを解凍しトータルで 8 継代目の細胞を供していた。不具合の原因のひとつとして、細胞自体の活性が疑われたため、現地調査後、CERI ストック細胞及び韓国ストック細胞の活性を同時に測定し、比較を行った。

2.5.3. CERI 調製 DCC-FBS を用いた韓国でのアッセイの確認

韓国 NiFDS/FDA では、現地調査時、細胞培養培地に使用する dextran-coated-charcoal (DCC)